

# **Feromoninnehållande substansers effekt på hjärtfrekvensen hos kvigor i östrus och diöstrus**

**Kristina Nordéus**

**Handledare: Lennart Söderquist  
Inst. för kliniska vetenskaper  
Biträdande handledare: Renée Båge  
Inst. för kliniska vetenskaper**



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING .....	1
SUMMARY .....	1
INLEDNING .....	2
LITTERATURÖVERSIKT .....	3
Feromoner.....	3
Feromoner hos djur och människa.....	4
Feromoner hos nötkreatur .....	5
Brunstcykeln hos nötkreatur .....	6
Brunstcykelns faser.....	8
Feromoners påverkan på hjärtfrekvensen hos insekter .....	8
MATERIAL OCH METODER .....	10
Djurmaterial.....	10
Insamling av substanser .....	10
Follikeldynamik.....	11
Mätning av hjärtfrekvens .....	12
Exponering.....	13
Utrustningstest .....	14
Statistisk analys .....	14
RESULTAT .....	15
Effekt av olika substanser .....	15
Effekt av cykelstadium .....	15
Effekt av djur .....	16
Effekt av kassetbyte .....	18
Effekt av lägesförändring.....	18
Effekt av utrustning .....	19
DISKUSSION.....	20
SLUTSATSER.....	21
ERKÄNNANDEN .....	22
LITTERATURFÖRTECKNING.....	23



## **SAMMANFATTNING**

Med ökad mjölkavkastning hos våra mjölkkor, följer ökad risk för försämrad fruktsamhet. Studier på djur och människa har visat att man kan påverka brunstcykeln genom exponering för feromoner, vilket innebär att feromoner potentiellt skulle kunna användas för att effektivisera reproduktionen. För att utvärdera bioaktiviteten hos aktuella substanser behövs ett in vivo-test eller en s.k. bioassay, dvs. ett test som utförs på levande djur. Hos insekter har man sett att ett snabbt svar på feromoner är en förändring i växlingen mellan låg och hög hjärtfrekvens. I det här försöket ville vi undersöka huruvida feromoner kan inducera en förändring i hjärtfrekvensen även hos nötkreatur. Vi följde två kvigor under tre brunstcykler och exponerade dem för tjururin, samt brunstslem och urin från brunstiga kor, dvs. substanser som kan förutsättas innehålla feromoner. Djuren exponerades för substanserna under både lutealfas (diöstrus) och högbrunst (östrus). Vi fann ingen signifikant skillnad i hjärtfrekvens vid exponering för de olika substanserna. Däremot var pulsen signifikant högre i brunst än under lutealfas oavsett exponering. Resultaten visar att registreringar av förändringar i hjärtfrekvensen inte tycks vara någon användbar parameter för att snabbt mäta effekten av potentiellt feromoninnehållande substanser på nötkreatur. Brunstcyklerna hos de två kvigorna synkroniserades dock något under försökets gång, vilket kan vara en effekt av feromoner. Detta tyder på att vidare studier rörande feromoners inverkan på brunstcykeln hos nötkreatur är av intresse.

## **SUMMARY**

With increased milkproduction in our dairy cattle, comes a risk for a reduced fertility. Studies performed on animals and humans have shown that it is possible to manipulate the oestrous cycle through exposure to pheromones. This means that pheromones could potentially be used to make reproduction more efficient. To evaluate the bioactivity of the substances in question, there is need for a bioassay. In insects, pheromones can induce a changed cardiac activity. In this study we wanted to examine whether the same also applied to cattle. We monitored three oestrous cycles in two heifers and exposed them to urine from bulls and to vaginal mucus and urine from cows in oestrus, substances thought to contain pheromones, during oestrus and dioestrus. We found that there was no significant change in heart rate due to exposure to pheromones. But we found that, in general, the heart rate was higher during oestrus than during dioestrus. The results show that heart activity seems to be a poor monitor of the effect of substances containing pheromones in cattle. We noticed, however, that during the study the oestrous cycles of the two heifers were somewhat synchronized, which may be caused by pheromones. This implies that further studies regarding the effect of pheromones on the oestrous cycle in cattle are of interest.

## INLEDNING

Svensk mjölkproduktion har under de senaste femtio åren gått från ett stort antal mindre besättningar till ett mindre antal stora besättningar. Samtidigt har man genom avel och utfodring fått fram kor som producerar större mängd mjölk. På bara tio år (1994-2004) ökade mängden energikorrigerad mjölk (ECM) per ko och år från 8 011 till 9 177 kg (Svensk mjölk, 2004). Det har dock visat sig att med ökad produktion följer en ökad risk för nedsatt fruktsamhet (Lean et al., 1989; Lucy, 2001). Till viss del, men inte fullt ut, kan man kompensera för det negativa sambandet mellan mjölkproduktion och fruktsamhet genom att i aveln selektera för god hälsa och hög fertilitet, samt genom att optimera miljö och utfodring.

För att optimera ekonomin vid användande av artificiell insemination (AI), är det viktigt att inte missa några brunster. Nyttjandet av exogena hormoner, som t.ex. prostaglandin, medför att man kan styra brunsterna i en besättning. På så sätt kan man öka andelen upptäckta brunster, men även koncentrera kalvningsperioden. I Sverige finns dock en motvilja hos konsumenterna mot användande av hormoner till djur. Detta har resulterat i att man fattat ett policybeslut inom Svensk Mjölk, vilket innebär att det inte är acceptabelt att använda exogena hormoner till mjölkkor, förutom vid embryotransfer och reproduktionsstörningar. Intresset är sålunda stort för att, om möjligt, utveckla en metod för att påverka brunstens tidpunkt och brunstsymptomens intensitet, utan användning av hormoner.

Försök på olika djurslag, såsom insekter, gnagare, svin, får, getter och nötkreatur, har visat att närvaron av ett handdjur kan inducera parningsbeteende och, i vissa fall, även påskynda puberteten samt återgången till normal cyklicitet efter förlossning hos hondjur av samma art (Rekwot et al., 2001). Hos kvinnor har man kunnat förskjuta menstruationscykeln genom att exponera dem för substanser från andra kvinnor (Stern & McClintock, 1998). Dessa effekter tros bero på doftämnen eller feromoner.

På kor har vissa försök rörande inverkan av feromoner gjorts, men inte i samma utsträckning som på andra djurslag. Detta kan t.ex. bero på att det är svårt att hålla nötkreatur på ett sätt som lämpar sig för sådana försök. Avsaknaden av relevanta studier på nötkreatur gör att kunskapen om feromoners effekt på reproduktionen är bristfällig. Vid SLU i Uppsala planeras en studie där man skall undersöka effekten av långvarig exponering för feromoner på brunstcykeln hos kvigor. En sådan studie är mycket tidskrävande eftersom den baseras på kons tre veckor långa brunstcykel. Därför behövs ett snabbare in vivo test, med vilket man kan testa bioaktiviteten hos substanser och olika fraktioner av urin och sekret från brunstiga djur.

Man skiljer mellan två grupper av feromoner, nämligen de med en omedelbar effekt ("releaser") och de med en fördröjd effekt ("primer") (Brennan & Keverne, 2004). Hos vissa insekter har man sett en snabb effekt vid olfaktoriska stimuli, t.ex. av feromoner i mycket låga koncentrationer, som visar sig i en övergång från långsam till snabb hjärtfrekvens. Genom att mäta hjärtfrekvensen kan man sålunda testa den olfaktoriska reaktiviteten (Angioy et al., 2003).

Syftet med denna studie är att undersöka effekten av potentiellt feromon-innehållande substanser på hjärtfrekvensen hos kvigor för att utvärdera om detta

skulle kunna vara ett lämpligt och snabbt in vivotest för framtida identifiering av feromoner. Resultat från tidigare studier på däggdjur tyder på att urin och slem från djur i brunst innehåller feromoner, varför vi valt att använda dessa substanser.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Feromoner

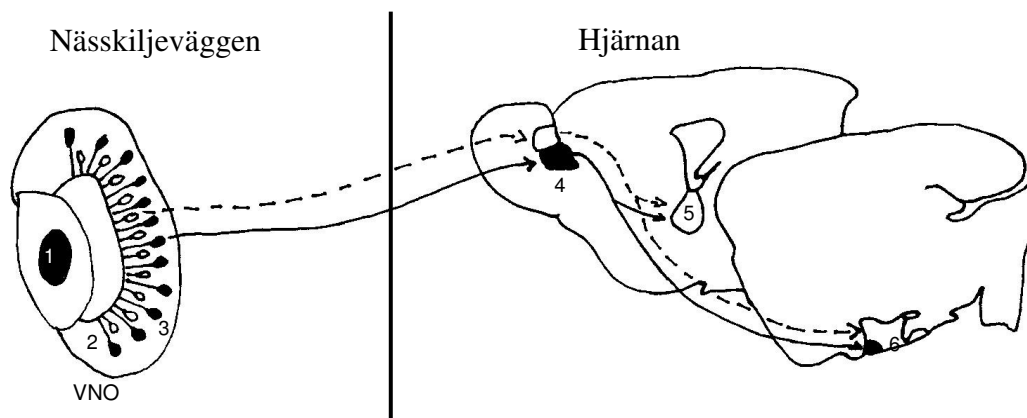
#### **Definition**

Ordet feromon är en sammansättning av grekiskans *pherein*, som betyder att bära, och ordet *hormon*, som i sin tur kommer från grekiskans *hormôn*, vilket betyder upphetsande. Feromoner är med andra ord ämnen som bär på något upphetsande. I en vid definition av begreppet feromon innefattas alla kemiska substanser, som kan överföra information mellan individer av samma art (Brennan & Keverne, 2004). I en snävare definition rör det sig om luftburna kemiska substanser, som kan framkalla endokrina eller beteendemässiga förändringar hos djur av samma art. Dessa substanser utsöndras i faeces, urin och från körtlar och uppfattas av det olfaktoriska systemet (Rekwot et al., 2001). Feromoner kan ha releaser-funktion, dvs. orsaka omedelbara beteendeförändringar, eller primer-funktion och då orsaka en långsammare effekt genom neuroendokrina eller utvecklingsmässiga förändringar (Brennan & Keverne, 2004). De förra kallas även signalferomoner (Rekwot et al., 2001). Ett exempel på en sådan omedelbar effekt är den induktion av parningsbeteende hos hanliga elefanter, som äger rum när de exponeras för urin från brunstiga honor (Rasmussen et al., 1997). Stern & McClintock (1998) visade att kvinnors menstruationscykel förskjuts när de exponeras för luktfria substanser från andra kvinnors armhålor. Detta är ett exempel på en fördröjd effekt av feromoner.

#### **Feromoner och luktsinnet**

Feromoner är volatila, dvs. flyktiga, molekyler som måste vara bundna till proteiner för att kunna transporteras i t.ex. vaginalsekret och urin. Dessa proteiner kallas lipokaliner. Det finns teorier om att lipokaliner även kan binda till receptorer och fungera direkt som kemosignaler. Hos de flesta däggdjur finns även ett välutvecklat vomeronasalt organ (VNO), vilket anses svara för kommunikationen med feromoner (Brennan & Keverne, 2004). Organet sitter i övergången mellan hårda gommen och nässkiljeväggen och består av två gångar, som delvis bekläds av olfaktoriskt epitel och som hos de flesta djurslag förbinder näs- och munhålan med varandra (Dyce et al., 1996). De vomeronasala sensoriska neuronerna befinner sig inte i luftströmmen, vilket gör att de är beroende av en vaskulär pumpmekanism för att komma i kontakt med doftmolekylerna. Denna mekanism sköts av det blodkärl som går genom VNO (figur 1). På så sätt kan neuronerna komma i kontakt med icke-flyktiga substanser som lipokaliner, men de kan även känna av flyktiga substanser lika väl som det olfaktoriska systemet. De vomeronasala sensoriska neuronerna sträcker sig till den accessoriska luktbulben, vilken i sin tur står i kontakt med hypothalamus via amygdala (mandelkärnan) och stria terminalis (slutstrimman). Detta utgör alltså en direkt väg för feromoners påverkan på beteende och neuroendokrinologi och många feromoneffekter utövas också via den vägen (Brennan & Keverne, 2004). Det anses att reglering av sexuellt beteende och handjurens detektion av brunstiga honor styrs genom VNO (Rekwot et al., 2001). Däremot har det visats att den snabba stegring av luteiniserande hormon (LH), som äger rum i anöstrala tackor

när de exponeras för hanliga kemosignaler, inte uteblir även om VNO är förstört (Cohen-Tannoudji et al., 1989). Det vomeronasala organet är sålunda inte det enda system som kan förmedla feromonell information.



Figur 1. Det vomeronasala organet (VNO) och dess nervbana. 1. Blodkärl 2. Sensoriskt epitel 3. Vomeronasala sensoriska neuron 4. Accessoriska bulbus olfactorius 5. Stria terminalis bäddkärna 6. Amygdala. De två typerna av neuron går till olika delar av de inblandade strukturerna. Efter Brennan & Keverne, 2004.

## Feromoner hos djur och människa

I saliven hos galtar finns substanser med feromoneffekt, vilka kan framkalla ståreflex hos sugga (Brennan & Keverne, 2004). Syntetiska analoger till dessa substanser säljs på burk som galtspray, vilket används för att få suggor att visa tydligare brunst utan att en galt är närvarande. Sprayen används även vid spermasamling på galt för att öka upplevelsen av konkurrens från andra handjur. Hos många djurslag, såsom gnagare, svin, får och get, påskyndar närvaron av ett handjur puberteten hos hondjur. Hos får talar man t.ex. om en baggeffekt. När en bagge introduceras i en grupp anöstrala tackor, som varit isolerade från handjur i ett antal veckor, ses en tidigare återgång till cyklicitet samt en varierande grad av synkronisering mellan tackorna. Hos flera djurslag kan närvaron av ett handjur även förkorta den period av anöstrus, dvs. utebliven brunst, som inträffar efter förlösningen. Hos t.ex. svin, get och får krävs inte närvaro av handjur, utan det räcker med enbart doften (Rekwot et al., 2001).

På humansidan visade McClintock redan 1970, att unga kvinnor som tillbringade mycket tid tillsammans hade synkroniserade menstruationscykler i högre grad än kvinnor om inte gjorde det. Hon menade att detta kunde bero på feromoner. I en senare studie (Stern & McClintock, 1998) exponerades kvinnor för tamponger, som först placerats i andra kvinnors armhålor. Exponering skedde genom att tampongen ströks under näsan på försökspersonen. Man fann då att effekten av tamponger, insamlade i sen follikelfas (definierad som perioden strax före LH-toppen) blev en tidigare LH-topp, vilket ledde till en förkortad menstruationscykel. LH-toppen innebär att maximal koncentration av luteiniserande hormon uppnås och detta sker synkront med högbrunstens insättande och styr ovulationen. Hos kvinnor som exponerades för tamponger insamlade i ovulationsfas (efter LH-toppen) senarelades LH-toppen, vilket därmed ledde till en förlängd



menstruationscykel. Man sade sig genom denna studie ha fått definitiva bevis för förekomsten av feromoner hos människa.

### **Feromoner hos nötkreatur**

I de feromonförsök som gjorts på nöt har man framför allt studerat tjurens effekt på kor och kvigor ur olika aspekter. Försök där prepubertala kvigor exponerats för tjur har givit varierande resultat. I vissa studier har exponerade djur blivit könsmogna tidigare än djur som ej exponerats. I andra studier har ingen sådan skillnad setts (Chenoweth & Spitzer, 1995). Närvaron av en tjur har i studier visat sig förkorta den anöstrala period som normalt följer efter förlossningen hos nöt. Hos kor med dålig näringsstatus är det dock troligt att en sådan tjureffekt uteblir, eftersom frisättning av LH till viss del styrs av näringsstatus (Rekwot et al., 2001).

Izard och Vandenbergh (1982) fann att kvigor som injicerats med PGF2 $\alpha$  och därefter exponerats för brunstslem och urin från brunstiga kor uppvisade högre grad av synkronicitet än de som injicerats, men inte exponerats för substanserna. I den förra gruppen var det även en högre andel som var i brunst redan 72 h efter injektionen. De fann även att kvigor som efter injektion exponerades för enbart brunstslem uppvisade större synkronicitet än de som exponerats för enbart urin eller vatten. En större andel av de djur som exponerats för slem, jämfört med djuren i de andra grupperna, var i brunst redan efter 72 h. Däremot var andelen dräktiga efter insemination lägst i den förra gruppen. Förekomsten av feromoner med priming-effekt i brunstslem hos brunstiga kor ansågs vara den troligaste förklaringen till resultaten. Nishimura et al. (1991) samlade brunstslem från kvigor för att därefter applicera substansen både på den kviga substansen kom ifrån, men i diöstrus, och på andra kvigor i diöstrus. De fann att resten av gruppen gjorde upphopp på den kviga från vilken substansen kom, men inte på de kvigor som fått främmande substans applicerad. Detta tyder på att vaginalsekretet, förutom brunstrelaterade feromoner, även kan innehålla individuella dofter.

Klemm et al. (1987) använde sig av ett in vivotest med tjurar för att analysera vaginalsekret från kor kring östrus. De fann nio olika sammansättningar i de prov som framkallat sexuellt beteende hos tjurarna och drog då slutsatsen att något eller några av dessa ämnen skulle kunna vara feromoner. Ramesh Kumar et al. (2000) analyserade kourin samlad under olika stadier i brunstcykeln med hjälp av gaskromatografi och fann att urinen från brunstiga kor innehöll två olika ämnen som inte fanns under de pre- och postovulatoriska stadierna. Dessa ämnen skulle kunna vara vad som olfaktoriskt särskiljer urinen under östrus från urin i andra stadier.

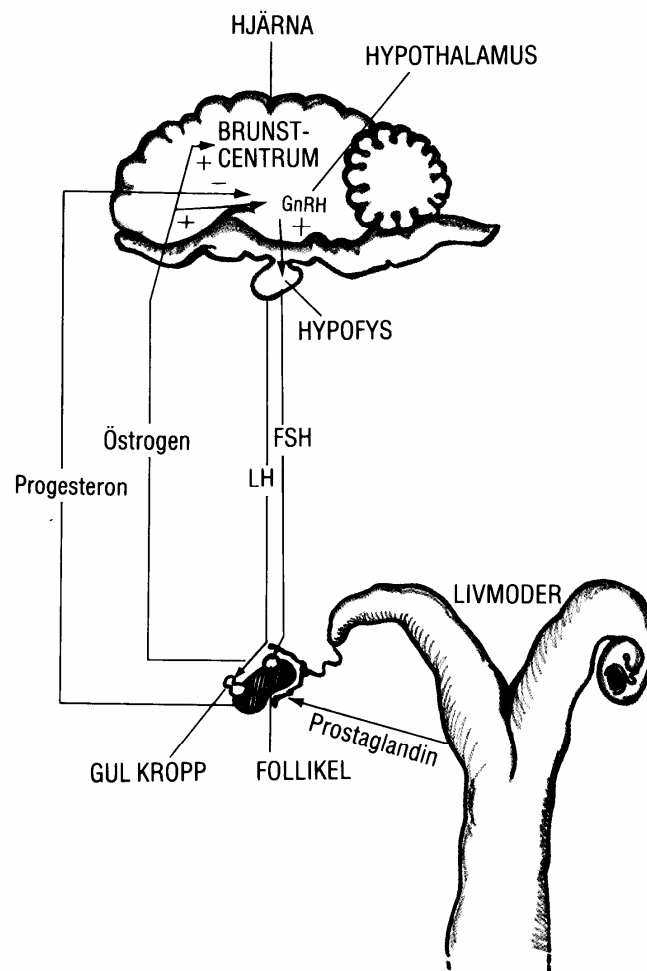
Dehnhard & Claus (1988) lyckades träna råttor att skilja mellan kourin samlad i brunst och i lutealfas. Med hjälp av detta in vivotest kunde de (1990) mäta bioaktiviteten i urinen från brunstiga kor genom att undersöka vilken dag i brunstcykeln som råttorna reagerade starkast. De fann att detta ägde rum ”dag -1”, dvs. dagen innan östrus. Vidare gjorde de (1995) ett försök att isolera och identifiera ett brunstspecifikt feromon genom att fraktionera och mäta bioaktiviteten i östrusurin. De fann då bl.a. att ämnet hade en låg molekylvikt, vilket innebär att det är mycket flyktigt. Däremot kunde de inte fraktionera ut ämnet så mycket att de kunde identifiera det.

Kiddy et al. (1984) använde hundar tränade att identifiera brunstrelaterade dofter hos kor och fick resultat som indikerade att dessa dofter finns spridda i alla kroppsvätskor, såsom flytningar, urin, mjölk och blodplasma.

## Brunstcykeln hos nötkreatur

### *Hormonspelet under brunstcykeln*

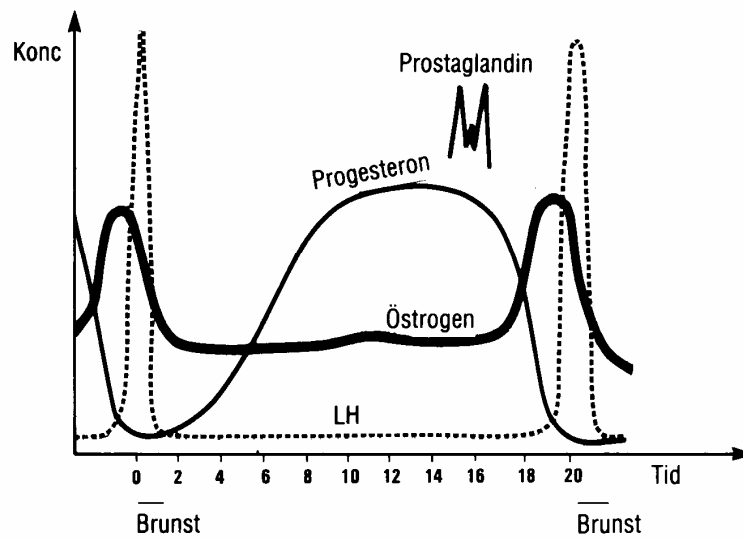
Gonadotropinfrisättande hormon (GnRH) produceras i hypothalamus och frisätts i hypofysens portasystem (figur 2). I hypofysens framlob finns gonadotropinproducerande celler, vilka svarar med att utsöndra gonadotropinerna LH (luteiniserande hormon) och FSH (follikelstimulerande hormon). Hypothalamus och hypofysen styr tillväxt och mognad av folliklar samt ovulationen och bildandet av en gulkropp. Äggstockarna kan i sin tur påverka hypothalamus och hypofysen genom frisättande av östradiol och progesteron (Noakes et al., 2001).



Figur 2. Hormonell påverkan under brunstcykeln hos nötkreatur. Från Gustafsson, 1987.

Under inflytande av FSH växer vågor av små folliklar till. Mognande folliklar producerar östradiol (figur 3). När lutealfasen går mot sitt slut sjunker nivåerna av progesteron från gulkroppen. Detta leder till att hypofysen kan frisätta stora mängder gonadotropiner. Effekten av höga nivåer FSH och låga nivåer

progesteron ger en stark stimulering av follikeltillväxten. FSH bidrar till att hållrumsförsedda (antrala) folliklar bildas. Den antrala follikeln börjar så småningom producera inhibin, vilket hämmar frisättningen av FSH. Minskningen av mängden FSH är, tillsammans med den ökande känsligheten för LH hos granulosa-cellerna, bidragande faktorer i selektionen av den dominanta follikeln. Strax innan de beteendeförändringar som är förknippade med brunst börjar, sker en stor ökning av östradiol, vilket leder till en kraftig LH-frisättning. Under inverkan av denna LH-topp sker den slutgiltiga mognaden av follikeln och ovulationen (Noakes et al., 2001).



Figur 3. Brunstcykelns hormoner i blodet hos nötkreatur. Från Gustafsson, 1987.

Nötkreatur har i genomsnitt 2-3 follikelvågor i varje brunstcykel. I varje våg börjar flera folliklar växa till. En eller två av dessa selekteras och utvecklas till en dominant follikel. Efter selektionen är den dominanta follikeln ca 8,5 mm i diameter. Den uppnår sedan sin maximala storlek (12-20 mm) efter 6-7 dagar. Efter ytterligare några dagar går den dominanta follikeln i atresi och lämnar plats för en ny våg. Detta fortsätter så länge som höga progesteronnivåer förhindrar ovulation. När gulkroppen tillbakabildas kan den dominanta follikeln genomgå den slutgiltiga differentieringen för att sedan ovulera (Mihm et al., 2002). Selektionen av den dominanta follikel som skall ovulera äger rum ca 3-4 dagar före ägglossningen (Noakes, 1997).

Vid ovulationen töms follikeln på sitt innehåll och faller ihop och den kollapsade follikeln blodfylls. Granulosa- och thecaceller, som hypertrofierar och luteiniserar under inverkan av bl.a. LH, bildar därefter en gulkropp där follikeln tidigare funnits. Gulkroppen bildar progesteron och den maximala aktiviteten uppnås kring dag 7-8 efter ovulation, för att sedan avklinga och upphöra runt dag 18. Den maximala storleken på gulkroppen ligger kring 25 mm i diameter. Höga nivåer progesteron förhindrar ovulation. Om djuret inte blivit dräktigt, dvs. om fostrets signalering uteblir, frisätts den luteolytiska substansen  $\text{PGF2}\alpha$  från livmodern och gulkroppen bryts ner och går i atresi. Frisättningen av  $\text{PGF2}\alpha$  induceras av

oxytocinfrisättning från gulkroppen. Först sker en snabb funktionell avstängning och därefter bryts gulkroppen ner under längre tid (Noakes et al., 2001).

### **Brunstcykelns faser**

En brunstcykel uppgår hos kor, i genomsnitt, till 21 dagar och hos kvigor till 20 dagar (Noakes et al., 2001). Cykeln delas upp i fyra olika faser: proöstrus, östrus, metöstrus och diöstrus. Dessa kan särskiljas genom förändringar i yttre genitalia och beteende hos djuret.

#### ***Proöstrus***

Förbrunsten varar i genomsnitt i något mer än ett dygn. Gustafsson et al. (1985) fann i en studie att durationen var  $25,2 \pm 4,7$  h och Båge et al. (2002) fann att den var  $27,5 \pm 10,7$  h. Under den här fasen visar djuret tecken till oro, men även sexuellt intresse för andra djur. I yttre genitalia kan man se ökad rodnad och svullnad, samt flytningar. I äggstockarna kännetecknas förbrunsten av en ökad tillväxt av den dominanta follikeln och tillbakabildande av gulkroppen (Noakes et al., 2001).

#### ***Östrus***

Högbrunsten är den period då hondjuret är parningsvilligt och står för upphopp. Blygdens svullnad och rodnad tilltar ytterligare och en riklig klar flytning ses. Vid rektal palpation har livmodern en kraftig tonus (Noakes et al., 2001). Gustafsson et al. (1985) definierade övergången mellan proöstrus och östrus som den tidpunkt då djuret första gången svankar spontant. De fann i sin studie att östrus hos kvigor varade  $23,8 \pm 2,0$  h. Ståbrunsten, då djuren stod för tjur, befanns i samma studie vara  $26,6 \pm 1,8$  h. Enligt Båge et al. (2002) varar perioden av stark östrus, då hänsyn tas till oro, råmande, slickande, svankning, svullnad och rodnad i vulva, flytning och tonus i livmodern, i  $15,2 \pm 5,4$  h hos kvigor. Detta stämmer väl överens med den traditionella uppfattningen att östrus i genomsnitt varar i 15 h, men med en stor variation. Högbrunstens start är synkron med LH-toppen (Noakes et al., 2001).

#### ***Metöstrus***

Ovulationen äger rum ca 12 h efter högbrunstens slut, det vill säga i metöstrus. Under den här perioden mognar follikeln, ägglossningen äger rum och gulkroppen börjar byggas upp (Noakes et al., 2001). Djuren kan uppvisa blodiga flytningar, vilket sker hos ca 85 procent av alla kvigor och 55 procent av alla kor (Gustafsson, 1987). Gustafsson et al. (1985) fann att detta hos kvigor inträffade  $21,5 \pm 2,7$  h efter brunstens slut.

#### ***Diöstrus***

Diöstrus utgör perioden mellan metöstrus och proöstrus. Äggstockarna står då under inverkan av det progesteron som gulkroppen producerar (Noakes, 1997).

### **Feromoners påverkan på hjärtfrekvensen hos insekter**

Angioy et al. (2003) fann att hjärtaktiviteten var ett mycket känsligt mått för att undersöka den olfaktoriska sensitiviteten för könsferomoner och växtgifter hos malen *Spodoptera littoralis*. Den levande malen fixerades i vax för immobilisering. Därefter placerades elektroder på kroppen. Den normala

hjärtfrekvensen, i frånvaro av stimuli, varierade cykliskt mellan perioder med hög respektive låg frekvens. Vid stimulering med antingen feromoner eller växtdofter övergick långsam fas till snabb fas efter ca 1 sekund. Ingen förändring i hjärtfrekvens ägde rum om exponeringen inträffade under en snabb fas.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Djurmaterial**

I försöket ingick två kvigor av rasen SRB som lånades från Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV), Kungsängen, SLU. Kvigorna var under försöket uppstallade på Institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för komparativ reproduktion, obstetrik och juverhälsa, SLU. Försöket pågick mellan april och juni 2006. Kvigorna stod under denna tid uppbundna i två angränsande rum i avdelningens isoleringsstall. Rummen var förbundna med en dörr som hölls stängd under försökets gång. Ljud och dofter kunde dock i viss mån uppfattas mellan rummen, även om försökspersonalen försökte minimera detta genom att byta skyddskläder och tvätta händerna när de gick mellan rummen. Tillträde till rummen skedde via två dörrar mot en utegård, dvs. aldrig direkt mellan rummen. Vid försökets början var kvigorna ca 15 månader gamla och i normalt hull. Djuren var könsmogna med regelbunden cyklicitet, men de var ej inseminerade.

### **Insamling av substanser**

#### ***Tjururin***

Den tjururin som användes under försöket samlades från en två år gammal tjur av rasen Charolais. Tjuren tillhörde Karl-Eriks Charolais Avel & Kött AB och stod uppstallad på Qvallsta säteri. Urinen samlades i ett öppet kärl och drogs därefter upp i engångssprutor (20 respektive 10 ml). Sprutorna förslöts sedan innan de infrystes vid -20°C (figur 4).

#### ***Kourin***

Urinen från brunstiga kor samlades från kor på Kungsängen, SLU. För att avgöra huruvida korna var i brunst bedömdes yttre brunstsymptom (förekomst av rodnad, svullnad, ståreflex och brunstflytning), äggstockarnas utseende vid ultraljudsundersökning och livmoderns tonus. Urinen samlades i ett öppet kärl och fördelades därefter i engångssprutor (10 respektive 20 ml). Dessa förslöts och infrystes vid -20°C. Vid ett tillfälle samlades urin från en ko som sprutats med prostaglandin för att framkalla brunst. I övriga fall rörde det sig om spontana brunster.

#### ***Brunstslem***

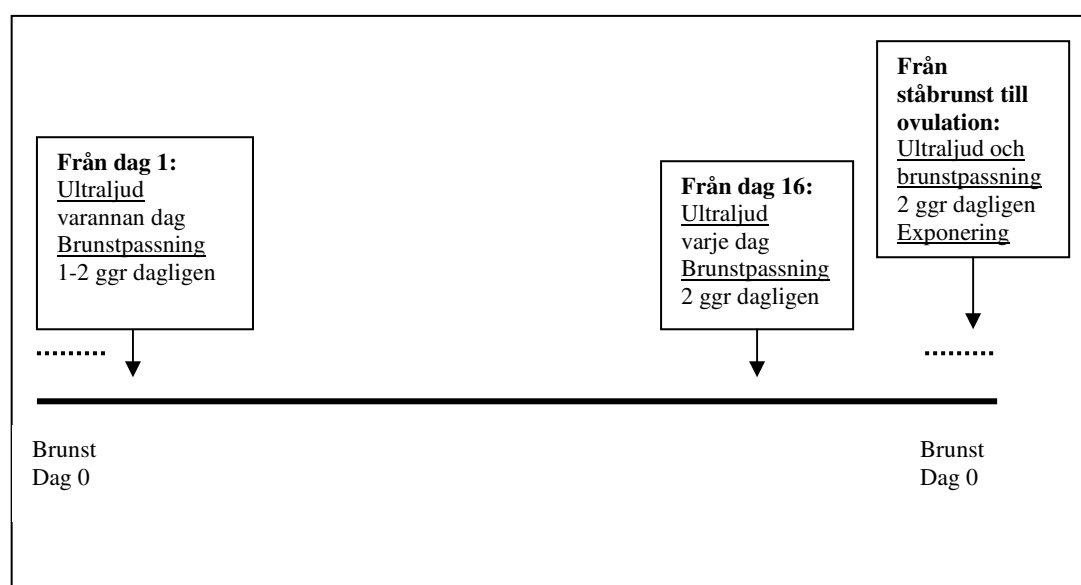
Brunstslem samlades in från samma kor som urinen och urvalskriterierna var desamma. Vid insamlingen användes specialgjorda tamponger. Dessa bestod av ca 2 m gasbinda (5 cm bred), som rullats till en tampong. Denna hölls ihop av ett bomullssnöre. Tampongerna var individuellt förpackade och autoklaverade. De fördes in i främre vagina med hjälp av ett spekulum och en engångsstrumpa normalt avsedd för en inseminationsspistolett. Tampongerna fick sitta i vagina i 1,5-2 timmar. Därefter togs de ut och placerades i en burk som, inom några timmar, frystes ned till -20°C.



Figur 4a. Urin från tjur och brunstig ko. 4b. Tampong för insamling av brunstslem. Foto: Kristina Nordéus.

## Follikeldynamik

Innan försöket började fick kviorna en anpassningsperiod, bestående av en hel brunstcykel, för att vänja sig vid den nya miljön. Under denna brunstcykel, liksom fortlöpande under resten av försöket, följdes follikeldynamiken med hjälp av upprepade ultraljudsundersökningar (figur 5). Från dag 1 (första dagen efter östrus) till dag 15 undersöktes djuren rektalt med ultraljud varannan dag. Under denna period utfördes brunstkontroll en till två gånger dagligen. Från och med dag 16 till östrus utfördes ultraljudsundersökning varje dag och brunstpassning minst två gånger dagligen. Från ståbrunst till ovulation utfördes ultraljudsundersökning morgon och kväll. Vid ultraljudsundersökningen gjordes anteckningar om livmoderns tonus och strukturerna i äggstockarna, vilka tillsammans med anteckningar om yttre brunstsymptom fördes in i ett protokoll.



Figur 5. Tidschema över försökets olika moment.

## Mätning av hjärtfrekvens

Pulsen mättes och registrerades med hjälp av pulsmätare från Polar (Polar heart rate monitors S610 respektive S610i, Polar Electro Oy, Kempele, Finland). Elektroderna placerades uppe vid manken och nere vid hjärtat på vänster sida (figur 6). Huden rakades och fuktades med EKG-gel på dessa områden för att uppnå bättre överledning. Elektroderna och sändaren fixerades med en elastisk gjord och självhäftande binda. Mottagaren fästes under bindan. Under exponeringen registrerades pulsen automatiskt var femte sekund. Dessa värden kunde därefter med hjälp av medföljande programvara föras över för vidare analys i dator.



*Figur 6. Utrustning för registrering av hjärtfrekvens. 6b. Mottagaren till pulsmätaren.  
Foto: Lennart Söderquist.*



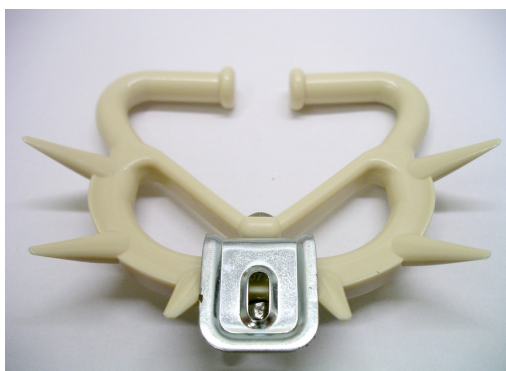
## Exponering

### *Tidpunkt för exponering*

Exponering för de olika substanserna ägde rum dels en gång under östrus dels en gång mellan dag 9 och 14 efter högbrunst, dvs. i lutealfas. Östrus definierades som den tidpunkt då djuret uppvisade kraftig rodnad och svullnad i vulva, hade rikliga genomskinliga brunstflytningar, svankade spontant eller vid beröring, samt hade kraftig tonus i livmodern och en stor (> 10 mm i diameter) follikel i äggstockarna. I försöket följdes djuren under tre på varandra följande brunstcykler och exponering skedde en gång per brunst (totalt tre exponeringar) och en gång per lutealfas (totalt två exponeringar).

### *Utrustning*

Eftersom eventuella feromoner troligtvis är mycket volatila, är det just de flyktiga delarna av substanserna som man vill exponera djuren för. Vid exponeringen användes därför en modifierad icke-invasiv nosring (Lantmännen Nordpost AB, Enköping), som normalt används för att förhindra diande, på vilken substanserna placerades i en kassett ca 10 cm från kvigans nos (figur 7). På nosringen skruvades en vinkelhake i metall fast. I kassetten, vilken bestod av en plastburk med snäpplock, placerades tampongen med aktuell substans samt en mycket kraftig magnet för att hålla fast kassetten vid nosringens metallbleck. Burken var försedd med en öppen slits som riktades mot djurets nos. Genom att använda ett flertal olika kassetter kunde byte mellan de olika substanserna snabbt och enkelt ske.



*Figur 7a. Modifierad nosring. 7b. Kassett med tampong och magnet. Foto: Kristina Nordéus.*

### *Schema över exponering*

Nosring och pulsmätare sattes på minst en timme innan exponeringen påbörjades för att utesluta en falskt hög hjärtfrekvens på grund av ovanan att bära utrustningen. De olika substanserna tinades i sina ursprungliga behållare i ett vattenbad (38°C). Därefter placerades de i en inkubator (38°C) för att hålla samma temperatur som djurets kropp. Under exponeringstillfällena stod djuren kvar i sina stallar och försökspersonal gick endast in för att byta kassetterna vid slutet av varje exponeringsperiod. För att undvika en s.k. novel-effekt, dvs. en reaktion på att ett nytt föremål introduceras, fick djuren under tomperioden ha en tom kassett fastsatt på nosringen. Vid varje exponeringstillfälle för respektive

substans registrerades hjärtfrekvensen under 10 minuter. Kassetterna med de olika substanserna byttes efter 10 minuter enligt ett rullande schema så att varje substans användes vid två tillfällen vid varje exponeringstillfälle. Vid alla försökstillfällen följdes samma schema (tabell 1).

*Tabell 1. Schema över exponeringar av de olika substanserna i varje försöksserie*

Tid (minuter)	Substans
0	Tjururin
10	<i>Tomkassett</i>
20	Vatten
30	<i>Tomkassett</i>
40	Kourin
50	<i>Tomkassett</i>
60	Brunstslem
70	<i>Tomkassett</i>
80	Brunstslem
90	<i>Tomkassett</i>
100	Kourin
110	<i>Tomkassett</i>
120	Vatten
130	<i>Tomkassett</i>
140	Tjururin
150	<i>Tomkassett</i>

## Utrustningstest

För att undersöka huruvida utrustningen hade någon effekt på hjärtfrekvensen gjordes även ett test där kvigorna fick stå med enbart pulsmätare under tre timmar. Därefter fästes nosringen i nosen och hjärtfrekvensen registrerades under ytterligare tre timmar.

## Statistisk analys

Materialet hanterades och analyserades med hjälp av variansanalys (PROC GLM) i SAS-programmet (Ver. 9; SAS Inst. Inc., Cary, NC). För varje kviga och provtagningsminut beräknades medeltal och variation (SD) för hjärtfrekvensen. Dessa värden utgjorde basen för de statistiska analyserna. Den statistiska modellen innehöll de fixa effekterna av kviga, substans, cykelstadium (brunst eller lutealfas), läge (dvs. om djuret har stått eller legat under hela observationen eller om det har ändrat läge) och tid efter kassettbyte (minut 1-10). Den innehöll även samspelen mellan cykelstadium och substans, samt mellan kviga och substans. De least squares-medeltal som beräknades för olika nivåer av effekterna som inkluderas i modellen jämfördes parvis med hjälp av t-test.

## RESULTAT

### Effekt av olika substanser

I tabell 2 redovisas signifikansen för de effekter som inkluderades i den statistiska modellen. Medelpulsen (oavsett cykelstadium) var signifikant högre ( $p < 0,01$ ) vid exponering för tjururin än under tomperioderna. Någon signifikant skillnad mellan de olika substanserna eller mellan de övriga substanserna och tomperioderna förelåg inte. Medelpulsen under tomperioderna hade en signifikant större spridning ( $p < 0,001$ ) än för de olika substanserna. Ingen skillnad i spridning förelåg dock mellan de olika studerade substanserna.

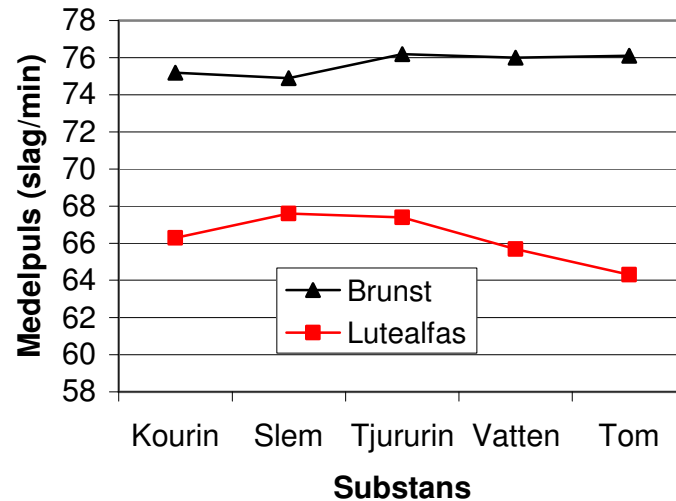
Tabell 2. Signifikans för inverkan av de effekter som inkluderades i den statistiska modellen

Parameter	Medelpuls	Hjärtfrekvensens spridning
Substans (tjururin, vatten, kourin, brunstslem)	Ej signifikant	$P < 0,001$
Cykelstadium (brunst eller lutealfas)	$P < 0,001$	Ej signifikant
Samspel mellan substans och cykelstadium	$P < 0,01$	Ej signifikant
Djuridentitet (kviga 1 eller kviga 2)	$p < 0,001$	$P < 0,001$
Samspel mellan individ och substans	Ej signifikant	Ej signifikant
Minut 1-10 (efter kassetbyte)	$P < 0,001$	$P < 0,001$
Läge (står/ligger eller ändrar)	$P < 0,001$	$P < 0,01$

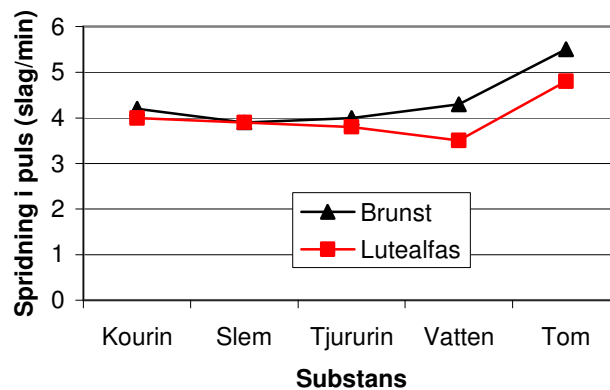
Vi fann ett signifikant samspel mellan substans och cykelstadium ( $p < 0,01$ ) vad gällde påverkan på medelpulsen, men inte på hjärtfrekvensens spridning. En parvis jämförelse av medelpulsen vid exponering för de olika substanserna per cykelstadium gjordes. Under brunst förelåg ingen signifikant skillnad i medelpuls mellan de olika substanserna inklusive tomperioderna. Däremot, under lutealfas var medelpulsen i tomperioderna signifikant lägre än medelpulsen vid exponering för kourin ( $p < 0,05$ ), brunstslem ( $p < 0,001$ ) och tjururin ( $p < 0,001$ ). Dock, mellan substanserna förelåg ingen signifikant skillnad under lutealfas. Under brunst var hjärtfrekvensens spridning signifikant högre i tomperioderna än vid exponering för kourin, brunstslem, tjururin ( $p < 0,001$ ) och vatten ( $p < 0,01$ ). Under lutealfas var hjärtfrekvensens spridning under tomperioderna högre än vid exponering för brunstslem ( $p < 0,05$ ), tjururin ( $p < 0,05$ ) och vatten ( $p < 0,01$ ).

### Effekt av cykelstadium

Medelpulsen i brunst, utan hänsyn taget till substans, var 75,7 slag/minut, vilket var signifikant högre ( $p < 0,001$ ) än medelpulsen i lutealfas som var 66,3 slag/minut (figur 8). Ingen signifikant skillnad i hjärtfrekvensens spridning förelåg dock mellan de två cykelstadierna (figur 9).



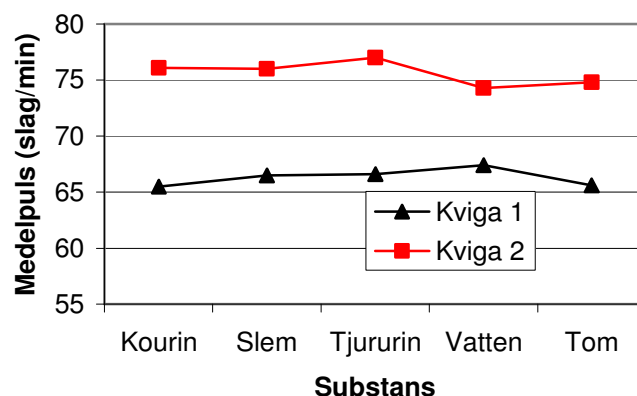
Figur 8. Medelpuls vid exponering för olika substanser under brunst respektive lutealfas.



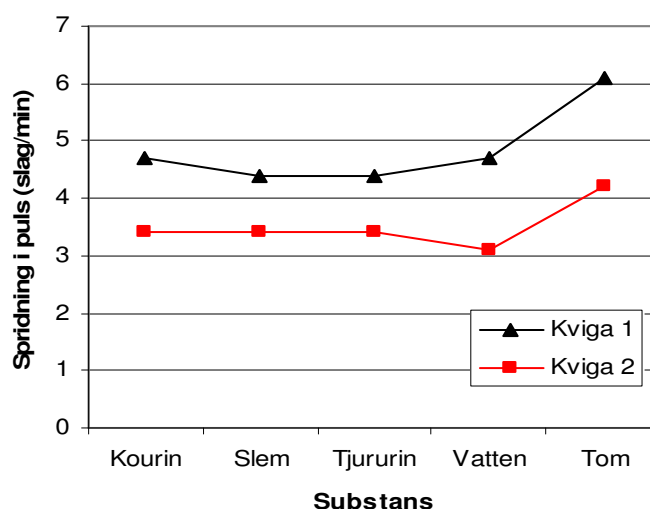
Figur 9. Spridningen i hjärtfrekvens vid exponering för olika substanser under brunst respektive lutealfas.

## Effekt av djur

Vi fann inget samspel mellan individ och substans, dvs. individernas reaktion på de olika substanserna skiljde sig ej signifikant åt. Mellan de bägge försöksdjuren förelåg en signifikant skillnad ( $p < 0,001$ ) i medelpuls (figur 10). Hos kviga 1 var medelpulsen, under brunst och lutealfas sammanslaget, 66,3 slag/minut. Hos kviga 2 var den 75,6 slag/minut. Spridningen i medelpuls var signifikant högre ( $p < 0,001$ ) hos kviga 1 än hos kviga 2 (figur 11).



Figur 10. Medelpuls hos de båda kvigorna vid exponering för olika substanser under brunst och lutealfas.

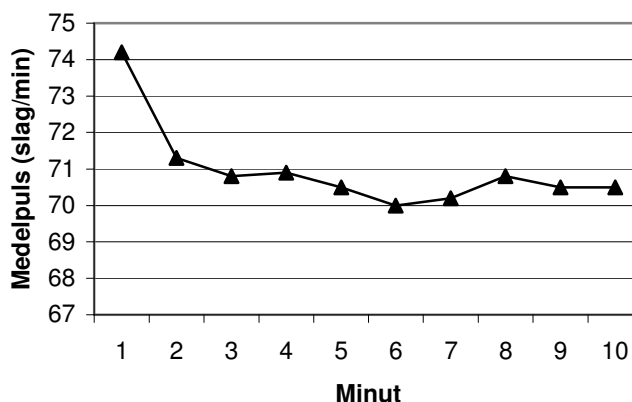


Figur 11. Spridning i hjärtfrekvens hos de båda kvigorna vid exponering för olika substanser under brunst och lutealfas.

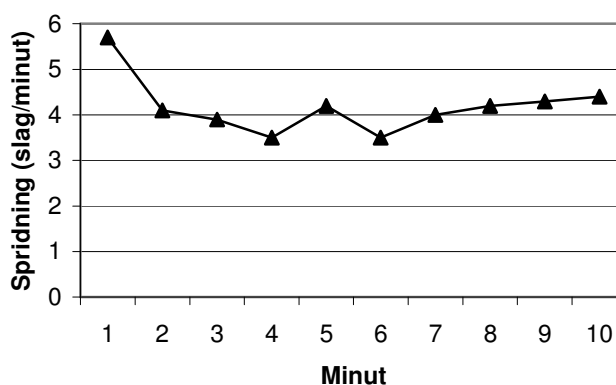
När effekten på medelpulsen av de olika substanserna jämfördes per kviga fann vi att medelpulsen hos kviga 1 var signifikant lägre ( $p < 0,05$ ) under tomperioderna än vid exponering för vatten. I övrigt förelåg ingen skillnad mellan substansernas effekt på hjärtfrekvensen. Hos kviga 2 var medelpulsen vid exponering för tjururin signifikant högre ( $p < 0,01$ ) än under tomperioderna och vid exponering för vatten. Medelpulsen var vid exponering för tjururin 77 slag/minut och vid exponering för vatten 74,3 slag/minut. För kviga 1 var spridningen i hjärtfrekvens signifikant högre i tomperioderna än vid exponering för kourin, brunstslem, tjururin och vatten ( $p < 0,001$ ). Även hos kviga 2 var spridningen i hjärtfrekvens signifikant högre under tomperioderna än vid exponering för kourin ( $p < 0,05$ ), brunstslem ( $p < 0,05$ ) och vatten ( $p < 0,01$ ).

## Effekt av kassettbyte

Under den första minuten av varje 10-minutersperiod, oberoende av substans, låg medelpulsen betydligt högre än under de övriga minuterna av exponeringen (figur 12). Vid den parvisa jämförelsen skiljde sig minut 1 signifikant ( $p < 0,01$  för minut 2 och  $p < 0,001$  för minut 3-10) från övriga minuter. Även spridningen i hjärtfrekvens var betydligt större under den första minuten (figur 13). Spridningen i hjärtfrekvens under minut 1 var signifikant större ( $p < 0,001$ ) än för övriga minuter.



Figur 12. Medelpuls för minut 1-10 vid exponering.



Figur 13. Spridning i hjärtfrekvens för minut 1-10 vid exponering.

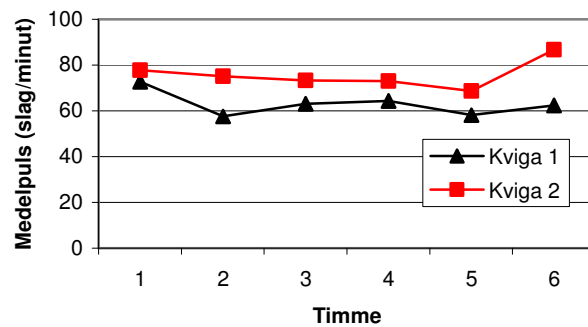
## Effekt av lägesförändring

Medelpulsen för alla observationer då djuren stått upp eller legat ned under hela exponeringen jämfördes med medelpulsen för de observationer då djuren ändrat läge under exponeringen. Medelpulsen då djuren ändrat läge (under 10-minutersperioden) var 71,7 slag/minut, vilket var signifikant högre ( $p < 0,001$ ) än medelpulsen då djuren ej ändrat läge, vilken var 70,2 slag/minut. Spridningen i hjärtfrekvens bland de observationer då djuren ändrat läge var signifikant högre

( $p < 0,01$ ) än för de observationer då djuren förblivit stående eller liggande. Standardavvikelsen för den förra gruppen observationer var 4,5 slag/minut och för den senare 3,9 slag/minut.

### Effekt av utrustning

Medelpulsen per timme 1-6 beräknades för de bägge kvigorna. Hos bägge djuren var hjärtfrekvensen i genomsnitt högre under den första timmen än under de följande timmarna (figur 14). Hos kviga 2 ökade hjärtfrekvensen återigen under den sista timmen. Skillnaden mellan timmarna var dock inte statistiskt signifikant. Vi såg ingen förändring i hjärtfrekvens efter timme 3, då nosringen sattes på, vilket man kunnat förvänta sig.



Figur 14. Medelpulsen hos de båda kvigorna under timme 1-6.

## DISKUSSION

I vår studie såg vi ingen tydlig påverkan på hjärtfrekvensen vid exponering för potentiellt feromoninnehållande substanser. Det finns flera tänkbara förklaringar till detta.

Hos malen *S. littoralis* kan hjärtaktiviteten delas upp i en snabb respektive en långsam fas. Utan stimulering sker en cyklisk altemnering mellan dessa. Olika typer av stimuli, såsom olfaktoriska, visuella, gustatoriska och mekaniska, inducerar förändringar i hjärtaktiviteten. Detta fenomen utgör ett mycket känsligt verktyg för att undersöka mottagligheten hos insekten för dessa stimuli (Angioy et al., 2003). Hos nötkreatur finns inte någon sådan cyklicitet i hjärtaktiviteten. Hjärtfrekvensen ändras kontinuerligt, utan att följa något särskilt mönster. Vidare är nötkreatur flyktbenägna djur. Vid plötsliga ljud eller rörelser ökar pulsen snabbt för att sedan åter minska. Under försökets gång var det inte möjligt att hålla djuren på ett sådant sätt att andra stimuli, som olfaktoriska och auditiva, helt kunde undvikas. Huruvida kvigan stod upp, låg ned eller ändrade läge påverkade också pulsen. Man kan alltså anta att malar kan svara mer specifikt på enstaka stimuli än kvigor, som hela tiden påverkas av en hel rad olika faktorer.

En annan möjlig orsak till resultatet i undersökningen är tidsintervallen för exponering respektive återhämtning. I malförsöken gav exponering för feromoner respektive för en växtdoft effekt på hjärtaktiviteten efter ca 1 sekund. Effekten varade i mellan 40 och 50 sekunder. Ingen förändring skedde vid exponering i en snabb fas (Angioy et al., 2003). En möjlig förklaring kan vara att det faktiskt förelåg en förändring i hjärtaktiviteten även hos nöt, men att den var så kortvarig att den doldes av den stegring i hjärtfrekvens som inträffade vid kassetbytet. Medelpulsen och dess spridning var nämligen betydligt högre under den första minuten av exponeringen än under de följande.

Det är tänkbart att det förekommer feromoner i kroppsvätskor från både hon- och handjur hos nötkreatur, men att dessa enbart har primer-effekt. I så fall skulle man kunna se förändringar i brunstcykeln, utan att se någon releaser-effekt i form av t.ex. förhöjd hjärtfrekvens. En eventuell primer-effekt som svar på exponeringen studerades dock inte i den aktuella studien.

Tidigare studier på däggdjur har visat att individer kan vara mer eller mindre mottagliga för feromoner. Vi analyserade därför samspelet mellan individ och substans, men fann att något sådant samspel ej förelåg. Medelpulsen hos kviga 2 var dock högre vid exponering för tjururin än vid exponering för vatten och under tomperioderna. Detta skulle kunna vara en effekt av feromoner, men djurmaterialet är för litet för att man skall kunna dra några säkra slutsatser. Skillnaden i medelpuls mellan de bägge kvigorna var stor och det förelåg även skillnad i medelpulsens spridning, där den kviga som hade lägst medelpuls uppvisade störst spridning.

I en tidigare studie (Lewis & Newman, 1984) räknades hjärtfrekvensen hos nötkreatur med hjälp av stetoskop under 15 sekunder dagligen under brunstcykeln. Man fann att hjärtfrekvensen varierade under brunstcykeln, men att den tycktes vara låg (81,4 slag per minut) under högbrunsten (dag 0). Maximal hjärtfrekvens (84,7 slag per minut) uppmättes på dag 3. Av detta drog man



slutsatsen att förändringarna i hjärtfrekvens under brunstcykeln uppmätt på ett sådant sätt var för små för att kunna användas som brunstindikator. I vår studie fann vi dock att den genomsnittliga hjärtfrekvensen var signifikant högre ( $p < 0,05$ ) i brunst än i lutealfas. Däremot förelåg ingen signifikant skillnad i standardavvikelse, vilket betyder att pulsen låg stadigt i respektive fas. Vi fann att pulsen under brunst i genomsnitt låg drygt 9 slag per minut högre än under lutealfas. Medelpulsen i vår studie låg även betydligt lägre än vad Lewis och Newman rapporterat, vilket eventuellt kan förklaras med en novel-effekt vid den manuella mätningen i den senare studien. Vår mätmetod torde ge en mer rättvisande mätning av hjärtfrekvensen.

Det är inte troligt att utrustningen i vår studie hade någon påverkan på hjärtfrekvensen, eftersom djuren fick stå med utrustningen i en timme innan exponeringarna inleddes. Däremot var hjärtfrekvensen i genomsnitt högre och variationerna i frekvens var också större vid de observationer då djuren ändrat läge. Detta kan i viss mån ha påverkat resultatet.

Längden på brunstcyklerna varierade i den aktuella studien både mellan och inom de bägge individerna. Kviga 1 hade sin första högbrunst tre dygn före kviga 2 och slutligen sin fjärde brunst drygt ett halvt dygn efter kviga 2, vilket skulle kunna tolkas som en tendens till synkronisering. Det statistiska underlaget är dock för litet för att någon säker slutsats skall kunna dras huruvida detta orsakats av substanserna eller av något annat. En möjlig förklaring till den synkroniseringstendens vi fann skulle kunna vara den biostimulering i form av ljud och lukt (Jochle, 1975) som djuren exponerats för under de något suboptimala försöksbetingelserna.

## **SLUTSATSER**

Då exponering för substanser, som sannolikt innehåller feromoner, inte generellt gav någon förhöjd hjärtfrekvens hos försöksdjuren, vare sig under brunst eller i lutealfas, blir slutsatsen att mätning av hjärtfrekvensen inte utgör ett potentiellt in vivo test för att snabbt kunna utvärdera bioaktiviteten hos olika feromoninnehållande substanser.

Vi fann dock att pulsen i brunst var signifikant högre än i lutealfas. En kontinuerlig mätning av hjärtfrekvensen hos kvigor, med hjälp av t.ex. pulsmätare, skulle därför teoretiskt kunna användas för att få indikation på om djuret är på väg in i brunst. Med den nu använda utrustningen är den praktiska användningen dock begränsad.

Det fanns en tendens till brunstsynkronisering under försökets gång. Det kan inte uteslutas att denna synkronisering var en primer-effekt orsakad av feromoner. Därför är ytterligare försök rörande feromoners inverkan på nötkreatur fortfarande av stort intresse, även om någon snabb effekt på hjärtfrekvensen inte kunde påvisas i den här begränsade studien.

## **ERKÄNNANDEN**

Ett stort tack till alla som hjälpt mig:

Min handledare Lennart Söderquist för hantlangning och sällskap under försöken, samt hjälp med den skriftliga sammanställningen och mycket mer.

Min biträdande handledare Renée Båge som lärde mig använda ultraljud och som med glatt humör ryckte ut vid kriser av olika slag.

Resten av feromongänget, Hans Gustafsson och Fredrik Hultén, i egenskap av oförtrytliga idésprutor.

Nils Lundeheim för ovärderlig hjälp med den statistiska analysen och oändligt tålamod.

Personalen på Kungsängen för lån av kvigor och för all handräckning vid insamlande av substanser.

Rickard Ignell för insektsexpertis.

Familjerna Helgesson och Nordéus för hjälp med språkliga oklarheter och bångstyriga datorer.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Angioy, A. M., Desogus, A., Tomassini Barbarossa, I., Anderson, P., Hansson, B. S. (2003) Extreme sensitivity in an olfactory system. *Chem. Senses* 28, 279-284.
- Brennan, P. A., Keverne, E. B. (2004) Something in the air? New insight into mammalian pheromones. *Curr. Biol.* 14, R81-R89.
- Båge, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H. (2002) Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology* 57, 2257-2269
- Chenoweth, P. J., Spitzer, J. C. (1995) Biostimulation in livestock with particular reference to cattle. *ARTA* 7, 271-278.
- Cohen-Tannoudji, J., Lavenet, C., Locatelli, A., Tillet, Y., Signoret, J. P. (1989) Non-involvement of the accessory olfactory system in the LH response in anoestrous ewes to male odour. *J. Reprod. Fertil.* 86, 135-144.
- Dehnhard, M., Claus, R. (1988) Reliability criteria of a bioassay using rats trained to detect estrus-specific odor in cow urine. *Theriogenology* 30, 1127-1138.
- Dehnhard, M., Claus, R. (1990) Variation in estrus-related odors in the cow and its dependency on the ovary. *Theriogenology* 35, 645-652.
- Dehnhard, M., Claus, R. (1995) Attempts to purify and characterize the estrus-signalling pheromone from cow urine. *Theriogenology* 46, 13-22.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. 1996 Textbook of veterinary anatomy, 2nd ed. W. B. Saunders. 346.
- Gustafsson, H. (1987) Reproduktionsfysiologi: Hondjur. Ur: Swenson, T., Söderquist, L. (Red.) Artificiell insemination och reproduktion. Meddelande 149, Svensk husjursskötsel. 52-58.
- Gustafsson, H., Kindahl, H., Larsson, K., Madej, A. (1986) Sequential endocrine changes and behaviour during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 19, 261-273.
- Izard, M. K., Vandenberg, J. G. (1982) Priming pheromones from estrous cows increase synchronization of estrous in dairy heifers after PGF-2 $\alpha$
- Jochle, W. (1975) Current research in coitus-induced ovulation: a review. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 22, 165-207.
- Kiddy, C. A., Mitchell, D. S., Hawk, H. W. (1984) Estrus-related odors in body fluids of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67, 388-391.
- Klemm, W. R., Hawkins, G. N., De Los Santos, E. (1987) Identification of compounds in bovine cervico-vaginal mucus extracts that evoke male sexual behavior. *Chemical senses* 12, 77-87.
- Lean, I. J., Galland, J. C., Scott, J. L. (1989) Relationships between fertility, peak milk yields and lactational persistency in dairy cows. *Theriogenology* 31, 1090-1103.
- Lewis, G. S., Newman, S. K. (1984) Changes throughout estrous cycles of variables that might indicate estrous in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67, 46-152.
- Lucy, M. C. (2001) Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy. Sci.* 84, 1277-1293.
- McClintock, M. (1970) Menstrual synchrony and suppression. *Nature* 229, 244-245.
- Mihm, M., Crowe, M. A., Knight, P. G., Austin, E. J. (2002) Follicle wave growth in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 191-200.

- Nishimura, K., Utsumi, K., Okano, T., Iritani, A. (1991) Separation of mounting-inducing pheromones of vaginal mucus from estrual heifers. *J. Anim. Sci.* 69, 3343-3347.
- Noakes, D. E. 1997. *Fertility and obstetrics in cattle*, 2nd ed. Blackwell science. 4-5.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. 2001. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*, 8th ed. B. W. Saunders. 3-28.
- Ramesh Kumar, K., Archunan, G., Jeyraman, R., Narasimhan, S. (2000) Chemical characterization of bovine urine with special reference to oestrus. *Veterinary Research Communications* 24, 445-454.
- Rekwot, P. I., Ogwu, D., Oyedipe, E. O., Sekoni, V. O. (2001) The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *J. Animal Sci.* 65, 157-170.
- Stern, K., McClintock, M. (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* 392, 177-179.
- Svensk mjölk (2004). Anslutning och medelavkastning i officiell kokontroll. [online] Tillgänglig: [www.statistik.svenskmjolk.se/tabels/anslutning05.pdf](http://www.statistik.svenskmjolk.se/tabels/anslutning05.pdf). [2006-11-27]